

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.09.015

实验研究

消岩汤对肺癌恶病质小鼠肌肉蛋白质降解的影响

张蕴超¹, 贾英杰[✉], 朱津丽¹, 赵林林¹, 刘宏根¹, 孔凡铭¹,
段浩博², 陈军¹, 孙一予¹, 于建春¹

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津市西青区昌凌路 88 号, 300381; 2. 天津中医药大学)

摘要 目的 探讨消岩汤治疗肺癌恶病质的可能作用机制。方法 将 40 只小鼠随机分为健康组、模型组、消岩汤组、醋酸甲地孕酮组, 每组 10 只。除健康组外, 其余各组通过接种肿瘤细胞建立肺癌恶病质模型。造模成功后模型组小鼠每日灌服生理盐水 1 ml, 消岩汤组每日灌服消岩汤 0.42 g, 醋酸甲地孕酮组每日灌服醋酸甲地孕酮 3.75 mg/d, 均给药 14 天。测定腓肠肌重量, 血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 含量及肌肉萎缩盒 F 基因 (MAFbx) 和肌肉环状指基因 1 (MURF-1) mRNA 表达。结果 与健康组比较, 模型组腓肠肌重量下降, 模型组和醋酸甲地孕酮组 TNF- α 、IL-6 水平及 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达均明显上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 消岩汤组腓肠肌重量明显增加, 血清 TNF- α 、IL-6 水平及 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 醋酸甲地孕酮组 TNF- α 、IL-6 水平均明显下降 ($P < 0.05$); 醋酸甲地孕酮组腓肠肌重量明显低于消岩汤组 ($P < 0.01$), 血清 TNF- α 、IL-6 水平及 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达明显高于消岩汤组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 消岩汤可能通过减少炎症细胞因子产生, 抑制 MAFbx 和 MURF-1 基因表达, 改善肺癌恶病质肌肉蛋白质降解, 从而改善肺癌恶病质状态。

关键词 肺癌; 恶病质; 消岩汤; 肌肉蛋白质; 炎症因子

癌症恶病质是最常见的癌症表现, 在首次确诊癌症时, 约有 50% 患者已发生消瘦等癌症恶病质征象, 晚期阶段患者则几乎均伴有癌症恶病质的典型表现^[1]。癌症恶病质是以脂肪组织和骨骼肌的严重消耗为主的进行性体重减轻, 其中骨骼肌蛋白大量消耗使体重下降, 会导致体质虚弱, 活动无力, 器官功能下降, 呼吸肌功能丧失, 是导致肿瘤患者高病死率和生存期缩短的重要因素^[2]。我们根据多年临床经验结合恶病质发病机理, 提出“正虚毒瘀”为癌症恶病质的病因病机, 前期研究显示, 消岩汤能改善肺癌恶病质患者临床症状, 提高患者生活质量, 延长生存期, 增加体重, 特别是在增加骨骼肌方面尤为突出^[3-4]。本研究旨在探讨中药消岩汤治疗肺癌恶病质的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

健康雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 40 只, 6~8 周龄, 体重 (20 ± 2) g, 由天津医科大学动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2012-0004。由天津医学科学研究所实验动物中心常规饲养。细胞瘤株为小鼠肺腺癌 Lewis 细胞系, 天津市灏洋生物制品科技有限责任公司提供。

1.2 药品

消岩汤是天津中医药大学第一附属医院院内制剂, 批号: 40019, 组成: 黄芪 30 g, 太子参 15 g, 夏枯草 10 g, 姜黄 15 g, 郁金 10 g, 白花蛇舌草 15 g, 牡蛎 30 g, 蜂房 15 g 等, 制成浓缩液, 相当于生药 0.42 g/ml, 放置 4℃ 冰箱中保存。醋酸甲地孕酮片由上海信谊康捷药业有限公司生产, 国药准字 H31020976, 2 mg/片, 批号: 040901, 将 250 mg 醋酸甲地孕酮片研磨成粉剂, 溶于生理盐水中制成

基金项目: 国家自然科学基金 (81303095); 天津市科技计划 (12ZCDZY15800)

* 通讯作者: jiayingjie1616@sina.com, 13821355381

浓度为 80% 的溶液。

1.3 主要试剂及仪器

肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 批号 20120065)、白细胞介素 6 (IL-6, 批号 20121123) 试剂盒均由美国 Sigma 公司生产; 肌肉萎缩盒 F 基因 (MAFbx) 和肌肉环状指基因 1 (MURF-1) 的 PCR 试剂盒由美国 RD 公司生产, 批号 5/2013; 氯仿, 天津化学试剂二厂, 批号 141120; 异丙醇, 华北地区特种试剂开发中心, 批号 140112; 无水乙醇, 天津市科锐思精细化工有限公司, 批号 131212。实时定量 PCR 仪, 杭州博日科技有限公司, 型号 Linegene9620; PCR 仪, 杭州博日科技有限公司, 型号 TC-96/g/h; 酶标仪, TECAN AUSTRIA 公司, 型号 A-5002; 净化工作台, 美国 Bio-Rad 公司, 型号 No400-400E; 显微镜, 日本 Nikon 公司, 型号 TE300; 离心机, 日本 HITACHI 公司, 型号 MIK-RO200R。

1.4 动物分组及造模

通过 SAS 9.2 软件产生随机数字, 将 40 只小鼠分为健康组、模型组、消岩汤组、醋酸甲地孕酮组, 每组 10 只。除健康组外, 其余各组小鼠适应喂养 7 天后, 建立肺癌恶病质模型^[4]: 取经连续传代 4 代的 Lewis 肺癌瘤源小鼠, 取其癌组织, 剪碎后加入适量生理盐水, 用玻璃研磨器制成细胞悬浊液, 200 目钢网过滤, 取过滤后的细胞悬浊液予台盼蓝染色计数, 调节细胞悬浊液浓度为 1×10^7 /ml, 然后将悬液接种于小鼠右下腋窝皮下, 每只 0.1 ml, 所有操作均在无菌条件下进行。小鼠接种肿瘤起为实验第 1 天, 后各组小鼠正常饲养至第 12 天, 小鼠开始出现颈背部皮毛毛糙、毛色发暗, 活动迟缓, 消瘦, 摄食、饮水量明显减少, 根据相关文献^[4]及前期预实验, 提示小鼠进入恶病质状态。

1.5 给药方法

造模成功后从第 13 天开始模型组和健康组小鼠每日灌服生理盐水 1 ml, 消岩汤组灌服消岩汤 0.42 g/d, 醋酸甲地孕酮组灌服醋酸甲地孕酮 3.75 mg/d。每组均灌胃 14 天。

1.6 检测指标及方法

给药完成后第 2 天, 各组小鼠分别摘取眼球, 收集血液, 离心后吸取血清, -20°C 保存待测。

1.6.1 腓肠肌重量 在采集完血液标本后以颈椎脱臼法处死所有实验小鼠, 连同肌腱无损失分离右下肢腓肠肌, 精确称量。

1.6.2 血清 TNF- α 、IL-6 含量 采用 Elisa 法, 按试剂盒说明进行操作。

1.6.3 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达 采用实时定量 PCR 检测, 引物由天津灏洋公司合成, MAFbx: 上游, 5' ACCGAAGAATCGTTTGAC3', 下游, 5' TCTGTTGCTCCACCCCTA3', 158bp; MURF-1: 上游, 5' GGGACGAAGACAAAGAGG3', 下游, 5' TC-CATAGCGTTTCCATCA3', 149bp; β -actin: 上游, 5' GCCTTCCTTCTTGGGTAT3', 下游, 5' CCTGGG-TACATGGTGGGTA3', 132bp。Trizol 法提取总 RNA: 取 100 mg 新鲜组织及 1 ml Trizol 放入干烤过的匀浆器中匀浆, 将匀浆液转移至 1.5 ml 的 Eppendorf 管中, 室温静置 5 min, 4°C 、12 000 r/min 离心 5 min, 弃沉淀, 将上清转移至另一个 1.5 ml 的 Eppendorf 管中。加入氯仿 (氯仿的比例为 200 μl 氯仿/1 ml Trizol), 充分振荡混匀, 室温静置 2~3 min, 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min。小心吸取上层水相置于另一个新的 Eppendorf 管中, 加入等体积预冷到 4°C 的异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置 10 min, 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 用 75% 乙醇 1 ml 洗沉淀, 4°C 、7 500 r/min 离心 5 min, 尽量弃净乙醇, 室温静置 5~10 min, 使沉淀自然干燥。溶于 DEPC 处理的 ddH₂O 中, 取 2 μl 稀释 100 倍后测 OD₂₆₀。实时定量 PCR 反应按照试剂盒说明书操作, 反应条件: 95°C 预变性 10 min, 94°C 变性 20 s, 58°C 退火加延伸 20 s, 40 个循环, 绘制熔解曲线。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件, 数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验过程中模型组小鼠死亡 2 只, 消岩汤组小鼠死亡 1 只。

2.1 各组小鼠腓肠肌重量比较

表 1 示, 各组小鼠腓肠肌重量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与健康组比较, 消岩汤组、醋酸甲地孕酮组、模型组小鼠腓肠肌重量明显下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 醋酸甲地孕酮组腓肠肌重量无明显改变 ($P < 0.05$), 消岩汤组腓肠肌重量明显增加 ($P < 0.01$); 醋酸甲地孕酮组腓肠肌重量明显低于消岩汤组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠腓肠肌重量、血清炎症细胞因子水平及 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	腓肠肌重量 (g)	TNF- α (pg/L)	IL-6 (pg/L)	MAFbx mRNA	MURF-1 mRNA
健康组	10	0.15 $\pm$ 0.01	25.94 $\pm$ 6.60	23.72 $\pm$ 0.96	1.65 $\pm$ 0.47	1.21 $\pm$ 1.67
模型组	8	0.12 $\pm$ 0.12 **	45.78 $\pm$ 9.25 **	36.20 $\pm$ 0.63 **	2.23 $\pm$ 1.38 *	2.52 $\pm$ 0.83 **
消岩汤组	9	0.13 $\pm$ 0.06 ** $\Delta\Delta$	29.84 $\pm$ 5.11 $\Delta\Delta$	25.61 $\pm$ 1.22 Δ	1.82 $\pm$ 0.35 $\Delta\Delta$	1.37 $\pm$ 1.02 $\Delta\Delta$
醋酸甲地孕酮组	10	0.12 $\pm$ 0.01 ** $\Delta\Delta$	36.42 $\pm$ 1.71 ** $\Delta\Delta$	30.16 $\pm$ 0.23 ** $\Delta\Delta$	2.19 $\pm$ 0.20 ** $\Delta\Delta$	2.57 $\pm$ 0.98 ** $\Delta\Delta$

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-6, 白细胞介素 6; MAFbx, 肌肉萎缩盒 F 基因; MURF-1, 肌肉环状指基因 1; 与健康组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与消岩汤组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组小鼠血清炎症细胞因子比较

表 1 示, 各组小鼠 TNF- α 和 IL-6 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与健康组比较, 模型组和醋酸甲地孕酮组 TNF- α 和 IL-6 水平均明显上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 消岩汤组及醋酸甲地孕酮组 TNF- α 和 IL-6 水平均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 消岩汤组 TNF- α 和 IL-6 水平明显低于醋酸甲地孕酮组 ($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达比较

表 1 示, 各组小鼠 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与健康组比较, 模型组和醋酸甲地孕酮组 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 消岩汤组 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$); 消岩汤组 MAFbx、MURF-1 mRNA 表达明显低于醋酸甲地孕酮组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

癌症恶病质在中医学中并无对应病名, 根据其临床表现归属于“虚劳”范畴。《素问·玉机真藏论》有“大骨枯槁, 大肉陷下, 胸中气满, 喘息不便, 其气动形, 期六月死”的记载, 与癌症恶病质的症状极其相似。癌症发病多为正气亏虚, 机体津液布散失司, 成痰成饮。痰饮聚于脏腑, 气机郁滞, 血行不利而致瘀。癌毒胶结, 耗伤正气, 消耗人体大量营养物质, 致脏腑功能低下, 影响脾胃运化功能。脾胃虚弱, 健运失职, 必影响通调水道, 则津液代谢障碍, 聚而生痰成饮。痰瘀互结于脏腑, 形成癌肿, 进一步耗伤正气, 日久则脾胃生化之源亏竭, 气血津液无以化生, 机体失养, 脏腑衰败而见虚劳之象, 治疗应扶正与祛邪相结合。本课题组根据多年临床经验结合恶病质发病机理, 认为治疗上应重视脾胃, 以扶正解毒祛瘀为法。肺癌恶病质之为病, 必有肺虚, 虚则补其母, 故培土生金, 母壮子健, 辅以解毒祛瘀之品, 方能标本共治。消岩汤具有扶正解毒祛瘀的功效, 方中黄芪、

太子参益气健脾、补肺养阴, 白花蛇舌草、蜂房清热解毒, 姜黄、郁金活血祛瘀, 牡蛎、夏枯草软坚散结, 诸药配伍, 共奏扶正解毒祛瘀之功^[5-7]。

TNF- α 现被认为是导致癌症恶病质的一个重要的炎症细胞因子, 由巨噬细胞分泌或由肿瘤细胞产生, 可激活核因子 κB (NF- κB) 途径, 增强泛素-蛋白酶体途径对蛋白的分解, 导致肌肉消耗增加^[8]。TNF- α 可以通过 IL-6 的介导, 抑制肌肉蛋白质的合成和减少瘦组织群的增殖, IL-6 还可以引发肌肉萎缩, 体重下降, 直接激活骨骼肌降解, 促进蛋白降解的作用^[9]。肌肉细胞内与蛋白质分解有关的主要是泛素蛋白酶体系统。MAFbx 和 MURF-1 是两种 E3 的相关蛋白, 是泛素蛋白连接酶最关键的环节。BODINE 等^[10] 证明 MAFbx 和 MURF-1 与肌肉萎缩密切相关, 证明单独抑制一个泛素连接酶, 可以调节多种因素诱发的肌肉萎缩。

本研究结果表明, 肺癌恶病质小鼠血清 TNF- α 、IL-6 炎症细胞因子水平升高, 肌肉萎缩, MAFbx 和 MURF-1 mRNA 表达升高; 中药消岩汤治疗肺癌恶病质小鼠可增加腓肠肌重量, 疗效优醋酸甲地孕酮组; 同时可显著降低 TNF- α 、IL-6 水平及 MAFbx 和 MURF-1 mRNA 表达。可见, 中药消岩汤可能是通过减少炎症细胞因子产生, 抑制泛素-蛋白酶体途径中 E3 相关蛋白 (MAFbx 和 MURF-1) 基因表达, 减轻癌症恶病质炎症反应, 改善肺癌恶病质肌肉蛋白质降解, 抑制肌细胞萎缩, 从而改善癌症恶病质状态。由于经费有限, 未能进行蛋白印迹实验, 将在今后进行更深入的研究。

参考文献

- [1] MONDELLO P, MIAN M, ALOISI C, et al. Cancer cachexia syndrome: pathogenesis, diagnosis, and new therapeutic options [J]. Nutr Cancer, 2015, 67(1): 12-26.
- [2] STENE GB, HELBOSTAD JL, AMUNDSEN T, et al. Changes in skeletal muscle mass during palliative chemotherapy in patients with advanced lung cancer [J]. Acta Oncol, 2015, 54(3): 340-348.

- [4] 张蕴超, 贾英杰, 路娜, 等. 基于“瘦素-摄食-免疫”网络的消岩汤改善癌症恶病质疗效分析 [J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(4): 29-31.
- [5] 李同度, 刘爱国, 牛旗. 康莱特抗癌症恶病质实验研究 [J]. 中国肿瘤临床, 1998, 25(2): 131-133.
- [6] 贾英杰, 张蕴超, 李小江, 等. 消岩汤联合 125I 粒子及热疗治疗中晚期肺癌疗效观察 [J]. 中医杂志, 2011, 52(9): 755-759.
- [7] 张蕴超, 贾英杰, 杨佩颖, 等. 消岩汤对肺癌恶病质小鼠肿瘤生长的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(6): 509-511.
- [8] 张蕴超, 张欣, 杨佩颖, 等. 中西医对癌症恶病质干预作用的研究概况 [J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(6): 504-507.
- [9] ONESTI JK, GUTTRIDGE DC. Inflammation based regulation of cancer cachexia [J]. Biomed Res Int, 2014, 168407. doi: 10.1155/2014/168407.
- [10] BODINE SC, LATRES E, BAUMHUETER S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy [J]. Science, 2001, 294(5547): 1704-1708.

Impact of Xiaoyan Decoction (消岩汤) on Muscle Protein Degradation in Lung Cancer Cachexia Mice

ZHANG Yunchao¹, JIA Yingjie¹, ZHU Jinli¹, ZHAO Linlin¹, LIU Honggen¹, KONG Fanming¹, DUAN Haobo², CHEN Jun¹, SUN Yiyu¹, YU Jianchun¹

(1. First Teaching Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300381; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Xiaoyan Decoction* (消岩汤) treating lung cancer cachexia. **Methods** Forty mice were randomized into healthy group, model group, *Xiaoyan Decoction* group and megestrol acetate group, 10 mice in each group. Other groups except the healthy group were established lung cancer cachexia models by cancer cells inoculation. After successful modeling, mice in the model group were given normal saline 1ml by gavage every day. The *Xiaoyan Decoction* group was given *Xiaoyan Decoction* 0.42 g by gavage every day. The megestrol acetate group was given megestrol acetate suspension 3.75 mg/d by gavage every day, all group treated for 14 days. The weight of gastrocnemius was measured. The content of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), expressions of muscular atrophy box F gene (MAFbx) and muscle ring finger 1 (MURF-1) mRNA were detected. **Results** Compared with the healthy group, the weight of gastrocnemius in the model group decreased. The content of TNF- α and IL-6, as well as the expressions of MAFbx and MURF-1 mRNA in the model group and the megestrol acetate group increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the weight of gastrocnemius in the *Xiaoyan Decoction* group increased. The content of serum TNF- α and IL-6, as well as the expressions of MAFbx mRNA and MURF-1 mRNA decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The content of TNF- α and IL-6 in the megestrol acetate group decreased ($P < 0.05$). The weight of gastrocnemius in the megestrol acetate group was much smaller than that in the *Xiaoyan Decoction* group ($P < 0.01$); the level of serum TNF- α and IL-6, as well as the expressions of MAFbx and MURF-1 mRNA were higher than those in the *Xiaoyan Decoction* group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Xiaoyan Decoction* may improve status of lung cancer cachexia through inhibiting the expressions of MAFbx and MURF-1 genes, improving muscle protein degradation and reducing inflammatory cytokines production.

Keywords lung cancer; cachexia; *Xiaoyan Decoction* (消岩汤); muscle protein; inflammatory cytokines

(收稿日期: 2015-09-16; 修回日期: 2016-01-05)

编辑: 王利芬